

WO9610179

Publication Title:

DIRECT HAPTENE DIAGNOSIS

Abstract:

Abstract of WO9610179

A device for rapidly assaying and characterising the presence of a molecule with a molecular weight of less than 10,000 daltons, i.e. a haptene, in a liquid sample, said device consisting of a hydrophilic support enabling capillary migration of a liquid therein, and having a plurality of separate regions in which the reagents are deposited and/or dried. The device consists of at least the following portions: (a) a receiving portion for the sample to be tested; (b) a reservoir portion containing a conjugate which is both marked with a marker enabling direct detection thereof, and also is a ligand for the molecule to be assayed, portions (a) and (b) being superimposed or sequential; (c) two successive barriers consisting of affinity pair moieties of which one, known as a negative reading barrier, retains said conjugate during migration thereof over the support when the desired molecule is not present in the sample, while the other retains said conjugate when the desired molecule is present, in which case said molecule is directly or indirectly bound to said conjugate, and said second barrier is known as a positive reaction reading zone; and (d) an absorptive portion arranged adjacent to the hydrophilic support for promoting liquid flow from the sample receiving portion (a) through the other portions that make up the device. Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : G01N 33/558, 33/543		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/10179
(21) Numéro de la demande internationale:	PCT/FR95/01259	(11) Numéro de publication internationale:	(43) Date de publication internationale: 4 avril 1996 (04.04.96)
(22) Date de dépôt international:	28 septembre 1995 (28.09.95)	(81) Etats désignés:	CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(30) Données relatives à la priorité:	94/11601 28 septembre 1994 (28.09.94) FR	Publiée	<i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>):	GKS TECHNOLOGIES [FR/FR]; Boîte postale 1005, 9, quai Moncouu, F-44035 Nantes Cédx 01 (FR).		
(72) Inventeurs; et			
(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>):	KADOUCHÉ, Jean [FR/FR]; 62, boulevard Arago, F-75013 Paris (FR). SAMAKE, Hamidou [FR/FR]; 19, rue des Balkans, F-75020 Paris (FR). GOUMARD, Philippe [FR/FR]; 62, rue Jean-Vauquier, F-93160 Noisy-le-Grand (FR).		
(74) Mandataires:	GUTMANN, Ernest etc.; Ernest Gutmann-Yves Plasseraud S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).		

(54) Title: DIRECT HAPTENE DIAGNOSIS

(54) Titre: DIAGNOSTIC DIRECT D'HAPTENES

(57) Abstract

A device for rapidly assaying and characterising the presence of a molecule with a molecular weight of less than 10,000 daltons, i.e. a haptene, in a liquid sample, said device consisting of a hydrophilic support enabling capillary migration of a liquid therein, and having a plurality of separate regions in which the reagents are deposited and/or dried. The device consists of at least the following portions: (a) a receiving portion for the sample to be tested; (b) a reservoir portion containing a conjugate which is both marked with a marker enabling direct detection thereof, and also is a ligand for the molecule to be assayed, portions (a) and (b) being superimposed or sequential; (c) two successive barriers consisting of affinity pair moieties of which one, known as a negative reading barrier, retains said conjugate during migration thereof over the support when the desired molecule is not present in the sample, while the other retains said conjugate when the desired molecule is present, in which case said molecule is directly or indirectly bound to said conjugate, and said second barrier is known as a positive reaction reading zone; and (d) an absorptive portion arranged adjacent to the hydrophilic support for promoting liquid flow from the sample receiving portion (a) through the other portions that make up the device.

(57) Abrégé

Dispositif d'analyse rapide et de caractérisation de la présence d'une molécule de poids moléculaire inférieur à 10 000 daltons, ou haptène, dans un échantillon liquide, ledit dispositif étant constitué d'un support hydrophile dans lequel un liquide est susceptible de migrer par capillarité, ayant une pluralité de régions distinctes dans lesquelles les réactifs sont déposés et/ou séchés, ce dispositif étant caractérisé par le fait qu'il est constitué au moins des zones suivantes: (a) une zone de réception de l'échantillon à tester, (b) une zone réservoir contenant un conjugué possédant la double caractéristique d'être marqué par un marqueur permettant sa détection directe et d'être un ligand pour la molécule à analyser, les zones en (a) et (b) pouvant être superposées ou séquentielles; (c) de deux barrières successives constituées de moitiés de paires d'affinité dont l'une retient ledit conjugué lors de sa migration sur le support en l'absence de la molécule recherchée dans l'échantillon, appelée barrière de lecture négative et l'autre retient ledit conjugué en présence de la molécule recherchée, cette dernière étant alors liée directement ou indirectement audit conjugué, cette deuxième barrière étant alors une zone de lecture positive de la réaction; (d) un moyen absorbant et contigu au support hydrophile permettant de favoriser le flux de liquide depuis la zone (a) de réception de l'échantillon à travers les autres zones constitutives dudit dispositif.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

DIAGNOSTIC DIRECT D'HAPTENES

La présente invention est relative à une méthode en phase solide de caractérisation et de dosage de molécules de poids moléculaire inférieur à 5 10 000 daltons dans un échantillon liquide, par utilisation d'un système alliant la chimie sèche et la chromatographie, l'utilisation de paires d'affinités de type antigène-anticorps ou streptavidine-biotine, un système simple de marquage, le tout permettant une lecture directe de la présence ou de l'absence de la molécule recherchée dans l'échantillon et permettant de lier directement le 10 signal observé à la concentration de la substance recherchée.

Les haptènes sont de petites molécules, de nature chimique diverse et de poids moléculaire inférieur à 10 000 daltons. Ils ont la particularité de ne pas être immunogènes. Ainsi, pour avoir des anticorps anti-haptènes, il est nécessaire de les coupler au préalable à une macromolécule dite protéine 15 porteuse qui est choisie habituellement parmi les protéines suivantes : sérum albumine, thyroglobuline, ovalbumine, fibrinogène et Keyhole Lympet Hémocyanine (KLH).

Les haptènes sont des substances ayant une grande diversité de groupes réactifs. Ces groupes constituent non seulement les éléments servant de base à 20 leur couplage mais aussi leurs immunodéterminants qui les distinguent des molécules qui leur sont analogues sur le plan structural.

Généralement, l'utilisation de ces groupes dans les couplages fait décroître la spécificité des anticorps anti-haptènes.

Même si dans certaines situations (en particulier «l'abus de drogue») la 25 reconnaissance d'une large gamme d'haptènes est recommandée, la recherche d'une excellente spécificité reste cependant de rigueur.

Cet objectif d'optimisation de la spécificité des anticorps anti-haptènes est atteint à partir d'une démarche incluant :

- la choix d'un groupe réactif commun aux molécules proches sur le plan 30 structural (analogues structuraux),
- l'utilisation d'un espaceur entre l'haptène et la protéine porteuse.

Le dosage des haptènes dans un échantillon et notamment dans les fluides biologiques nécessite l'obtention d'anticorps de qualité très spécifique. L'« hapténation » des macromolécules constitue une étape cruciale qu'il

convient de bien maîtriser ; il faut éviter en particulier le piège de la formation d'anticorps anti-protéine porteuse. Dans l'obtention des anticorps anti-haptènes, Van Weemans et Schuurs (1), (2), (3), ont depuis longtemps démontré l'existence de trois types d'hétérologie :

- 5 - l'utilisation de différents agents de couplage permet de distinguer une hétérologie de liaison (« bridge heterology »),
- le choix de différents sites de couplage sur les molécules d'haptènes permet le développement d'une hétérologie de sites,
- une troisième hétérologie concerne le cas où différents haptènes proches structurellement sont couplés à partir d'un même site en utilisant le 10 même agent de couplage.

La liaison protéine-haptène qui détermine la qualité de l'immunogène et, par la suite celle de l'anticorps, a lieu au niveau des groupes les plus réactifs. Les groupes ϵ et α aminés (pKa compris entre 8 et 10), sulfhydryques, 15 phénoliques (pKa de 9), imidazoles (pKa de 7) et carboxyliques (pKa compris entre 2 et 4) sont généralement utilisés pour ces liaisons protéine-haptène.

Le pKa, c'est-à-dire le pH auquel la moitié des groupes est protonée, détermine le changement de la réactivité en fonction du pH; les formes non protonées des groupes nucléophiles sont celles qui sont réactives.

20 Enfin, la réactivité des groupes de liaison des haptènes dépend aussi du micro-environnement du résidu à coupler.

Le dosage des haptènes nécessite au minimum plusieurs éléments :

- un anticorps d'excellente qualité,
- un système de dosage performant comprenant une phase solide et un 25 système de révélation très sensible.

En tant que petites molécules, les haptènes sont dosés préférentiellement par un système de compétition. Il s'agit en réalité de la compétition entre l'haptène à doser et l'haptène marqué pour des sites limités d'anticorps anti-haptène. Le signal observé est donc, par définition, inversement proportionnel à 30 la concentration d'haptène dans le fluide à doser : plus il y a d'haptène à doser plus le signal mesuré sera faible et réciproquement, plus le signal mesuré est élevé, plus faible est la concentration de l'haptène à doser.

Comme dans tous les systèmes de compétition, la mesure de la substance à doser est faite de façon indirecte. Ce qui pose des problèmes notamment dans les tests dits rapides à lecture directe sans instrumentation particulière, et dont l'interprétation doit être par conséquent très aisée.

5 De nombreux tests de diagnostic rapide de type bandelette ou apparenté utilisant la migration par chromatographie ou par capillarité de substances susceptibles de former des paires d'affinité avec des ligands et l'observation de la réaction ou de la non réaction avec ledit ligand ont été décrits. Aussi bien des méthodes par compétition ou des méthodes sandwich ont été développées
10 extensivement et de nombreux brevets ou demandes de brevets décrivent de tels systèmes ; parmi les plus proches du système de l'invention nous pouvons citer le brevet EP 306 772 décrivant un dispositif pour analyse rapide basé sur un système de chromatographie et dans lequel un moyen d'absorption des liquides en aval permet d'absorber les liquides réactionnels ; ce système
15 comporte au niveau d'une fenêtre de lecture un réactif permettant de détecter la présence de l'échantillon. Cependant ce système est adapté à la détermination directe d'une grosse molécule de type protéine.

La demande de brevet WO 91/12528 est relative à un dispositif de diagnostic rapide utilisant le principe de la chromatographie allié à la chimie sèche et dans lequel un système de capture de type avidine-biotine ou streptavidine-biotine permet de retenir au cours de la migration chromatographique un ligand préalablement couplé à la biotine. Le dispositif décrit dans cette demande de brevet permet de mettre en oeuvre des réactions de type sandwich entre deux substances immunologiquement réactives de type
20 antigène-anticorps ou encore des réactions de type compétition. Rien n'est dit dans cette demande de brevet sur la façon dont on pourrait de façon directe soit simple soit par une méthode sandwich doser des petites molécules de poids moléculaire inférieur à 10 000 daltons.

Dans l'ensemble des différentes publications décrivant des tests de diagnostic, peu sont consacrées à la détection de petites molécules. Parmi celles-ci on peut citer le brevet US 4 358 535, dans lequel Falkow et al; décrivent une méthodologie pour la détection de séquence d'ADN associée à des maladies et dans lequel la séquence d'ADN est fixée sous forme dénaturée,

simple chaîne sur un support de type nitrocellulose. Une sonde polynucléotidique marquée spécifique d'une séquence d'ADN particulière est alors mise en contact avec l'échantillon dans des conditions d'hybridation ; ce dispositif nécessite une étape de lavage pour enlever les sondes non hybridées.

5 Dans le brevet US 3 893 808, Campbell décrit un test de type bandelette pour la détection de contamination en plomb dans les carburants d'automobile. La bandelette ainsi décrite comprend trois zones : la première est imprégnée d'iode, la seconde est traitée avec un mélange d'iode et d'iodure de potassium; après application d'un échantillon du carburant sur la bandelette il y a migration 10 par capillarité à travers les deux zones jusqu'à une troisième zone où un indicateur est ajouté ; la présence de plomb est révélée par une coloration au niveau de la troisième zone par formation d'un complexe.

Dans le brevet US 3 895 914, Alberty et al. décrivent un test bandelette pour la détection de l'acide barbiturique et de leurs dérivés dans des fluides 15 biologiques. Le principe de cette méthode est la formation d'un complexe mercure-barbiturate et la détermination du mercure dans le complexe. La bandelette comprend un papier hydrophile ayant trois zones : la première est imprégnée avec un acide pour acidifier globalement l'échantillon, la deuxième est imprégnée avec un acétate de mercure tamponné capable de réagir pour former un complexe mercure barbiturate ; la troisième zone est imprégnée avec 20 un composé indicateur de la présence de mercure tel le diphenyl carbazone. Ce système qui semble être l'état de la technique le plus proche pour le dosage de petites molécules est malgré tout très éloigné du système proposé de l'invention dans lequel la lecture directe peut se faire par marquage d'un conjugué 25 susceptible de se lier avec la molécule recherchée lorsqu'elle est présente, le complexe étant alors capable d'être capturé par un ligand spécifique du complexe formé entre le conjugué et la molécule à rechercher. D'autres systèmes existent et forment l'arrière-plan technologique.

Le brevet EP 262 328 décrit également une bandelette pour l'analyse d'un 30 analyte dans un échantillon biologique au moyen d'une série séquentielle de réactions la bandelette étant constituée d'un matériau capillaire pour chromatographie et capable de transporter rapidement des réactifs de l'échantillon non immobilisé au départ au moyen d'un solvant

chromatographique ; cette bandelette est constituée de trois parties : un réservoir de départ , un réservoir à l'arrivée et entre les deux une série de zones imprégnées avec des réactifs mobiles ou immobilisés permettant des réactions spécifiques avec l'analyte. Ce système est cependant incapable de fonctionner en chimie sèche (sans addition de solvant) et en outre il implique une série de manipulations pour éventuellement modifier les tampons de chromatographie, manipulation incompatible avec un test rapide et peu onéreux.

A notre connaissance aucun test de diagnostic rapide n'a été décrit en vue d'une application simple qui est l'analyse et le dosage d'un haptène dans un échantillon par lecture directe et sans manipulation autre que la mise en contact du dispositif avec l'échantillon à analyser, ce qui est l'objet de la présente invention. Elle permet de pallier aux difficultés d'interprétation inhérentes aux tests par compétition qui existent aujourd'hui pour doser les haptènes, et de proposer aux usagers un moyen simple de détecter la présence d'un haptène, par exemple d'une drogue dans un échantillon biologique. Une application particulièrement attendue est celle d'un dosage rapide de l'existence d'une drogue dans le sang ou l'urine d'un individu dans un service d'urgence, où une information précise sur la drogue utilisée est nécessaire. D'autres types d'applications peuvent être envisagées notamment le suivi d'un traitement médicamenteux par exemple par des opiacés, des utilisations de type « médecine légale » permettant éventuellement de faire des tests sur sites etc...

Le système proposé par la présente invention et qui permet d'effectuer une lecture directe permettant de relier la concentration de la substance à doser au signal observé, consiste en un dispositif constitué d'un support hydrophile dans lequel un liquide est susceptible de migrer par capillarité, ayant une pluralité de régions distinctes dans lesquelles les réactifs sont déposés et/ou séchés, et permettant l'analyse rapide et la caractérisation de la présence d'une molécule de poids moléculaire inférieur à 10 000 daltons, (ou haptène), et présent dans un échantillon, ce dispositif étant caractérisé par le fait qu'il est constitué au moins des zones suivantes :

- a) une zone de réception de l'échantillon à tester,
- b) une zone réservoir contenant un conjugué possédant la double caractéristique d'être marqué par un marqueur permettant sa détection directe et

d'être un ligand pour la molécule à analyser, ces deux zones a) et b) étant superposées ou séquentielles,

c) de deux barrières successives constituées de moitiés de paires d'affinité dont l'une retient ledit conjugué lors de sa migration sur le support en l'absence de la

5 molécule recherchée dans l'échantillon, appelée barrière de lecture négative et l'autre retient ledit conjugué en présence de la molécule recherchée, cette dernière étant alors liée directement ou indirectement audit conjugué, cette deuxième barrière étant alors une zone de lecture positive de la réaction,

d) un moyen absorbant et contigu au support hydrophile permettant de favoriser

10 le flux de liquide depuis la zone a) de réception de l'échantillon à travers les autres zones constitutives dudit dispositif,

le support hydrophile et le moyen absorbant étant fixés sur un film de polyéthylène de type « Mylar », l'ensemble étant positionné dans un boîtier muni d'un réceptacle à l'aplomb de la zone a) acceptant 0,05 à 0,5 ml de liquide à

15 tester et de deux fenêtres à l'aplomb des deux barrières successives, permettant la lecture du résultat positif ou négatif de la réaction par l'observation du marquage lié au conjugué.

Dans le dispositif ainsi décrit, le réservoir est constitué d'un matériau choisi parmi la fibre de verre, la cellulose, les dérivés de cellulose, le nylon, des

20 polymères fibreux ou microporeux de type polyester haute densité, des fibres d'origine végétale, animale ou synthétique sous forme de poudres de comprimés ou de couches multiples ou de ouate de cellulose.

Dans un mode de réalisation simplifié, les zones a) et b) ne forment qu'une seule zone, et l'échantillon est déposé dans un réceptacle à l'aplomb du

25 réservoir.

Le marquage du conjugué doit être un marquage simple de lecture directe et dans lequel l'intensité de la révélation est liéé directement à la quantité de produit se trouvant dans l'échantillon.

Dans le dispositif de l'invention le conjugué est marqué soit par des

30 particules colloïdales contenant un métal, de préférence de l'or, soit par un marqueur organo-métallique. Le marquage d'un réactif par des particules d'or colloïdal a été décrit et utilisé dans de nombreux tests de diagnostic notamment les demandes de brevet WO/9112528 ou le brevet US 4 859 612 ou les

demandes de brevet EP 291 194 et EP 560 411. Il faut citer enfin les brevets EP 250 137 et EP 258 963.

L'invention consiste non pas à mettre en oeuvre un marquage par des particules colloïdales mais à utiliser ce marquage dans une combinaison mettant en jeu une zone réservoir contenant un conjugué déshydraté, les deux barrières de capture successives permettant d'avoir un signal que la réponse soit positive ou négative, et une grande stabilité du produit par le fait que l'ensemble des éléments constitutifs du dispositif sont déshydratés après leur dépôt permettant une conservation desdits dispositifs à température ambiante pendant une durée de plusieurs semaines à plusieurs mois.

Un des systèmes de capture utilisé particulièrement performant est le système avidine-biotine ou streptavidine-biotine.

Il constitue l'un des systèmes les plus importants pour les tests de diagnostic.

- 15 L'avidine a une affinité exceptionnellement élevée pour la biotine (10^{-15} M). La biotine est facilement couplée aux macromolécules notamment les protéines, sans perte d'activité.
- L'avidine est très stable et possède plusieurs sites de liaison et pourrait servir de molécule de pontage entre d'autres molécules biotinylées.
- 20 Ces propriétés lui permettent une considérable augmentation de la détectabilité (due à de faibles bruits de fond) dans les tests immunologiques.
- La biotine est l'un des douze facteurs hydrosolubles du complexe vitaminique B et constitue également un coenzyme pour les enzymes impliqués dans la carboxylation.
- 25 L'avidine est très stable sur une large gamme de pH et de température et le complexe avidine-biotine a lui-même une grande stabilité par rapport à la chaleur et les enzymes protéolytiques.
- L'avidine est une glycoprotéine basique avec un pl de 10,5 ; elle peut être cristallisée à partir de solutions salines de pH compris entre 5 et 7.
- 30 Elle a quatre sous-unités de 15 600 KD chacune et est également sensible à la lumière forte.
- Elle est absorbée sur le verre, comme généralement tous les solutés basiques. En revanche, une faible absorption sur le polyéthylène est aussi observée.

Chaque sous-unité de l'avidine est capable de se lier à la biotine dans une gamme de pH comprise entre 2 et 13.

Les sites de liaison de la biotine par l'avidine sont très profonds. Chaque atome de la biotine contribue fortement à cette interaction. Ainsi, plusieurs analogues 5 ou de petits fragments de biotine (urée, glycol, tétrahydrofurane, acide caproïque) sont susceptibles d'inhiber l'interaction avidine-biotine.

L'enfouissement relativement profond de la biotine est responsable de la très forte affinité. Cependant les quatre sites de liaison ne sont pas distribués de la même façon : deux sites sont trouvés très proches l'un de l'autre et, ainsi chaque 10 paire de sites de liaison fixerait uniquement une protéine biotinylée. Ainsi, contrairement à ce qui est communément admis, l'avidine avec ses paires de sites de liaison, se comporterait plus comme un agent de pontage entre deux protéines biotinylées plutôt que comme agent d'amplification.

Une protéine proche de l'avidine, la streptavidine provenant de *Streptomyces avidiini* est utilisée avec un gros avantage qui est celui d'avoir un bruit de fond 15 plus faible.

La streptavidine est une protéine extra-cellulaire de *Streptomyces avidiini* et sa partie fonctionnelle a un PM de 47 KD et comporte 4 sous-unités, ayant chacune un site de liaison de la biotine.

20 La liaison de l'avidine à la biotine n'est pas perturbée par des pH extrêmes, des sels ou même des agents chaotropiques comme l'hydrochlorure de guanidine (jusqu'à 3 M), l'urée, le chlorure de guanidine, etc...

En dehors des paires d'affinité antigènes/anticorps, ou avidine, ou streptavidine/biotine, d'autres systèmes de paires d'affinité peuvent être 25 rappelés ici et utilisés dans le dispositif de l'invention.

Il s'agit du système protéine A/immunoglobuline (Ig) :

La protéine A est extraite de la paroi cellulaire de *Staphylococcus aureus*. Elle a une forte affinité pour le fragment Fc de la plupart des Ig. Son PM est compris entre 42 et 56 KD et son pl est de 5.1. La constante d'équilibre de la 30 Protéine A avec les IgG varie considérablement selon les espèces et le pH, mais la liaison de l'antigène au Fab augmente l'affinité entre le fragment Fc des Ig et la Protéine A.

Le complexe Protéine A-Ig n'est pas affecté par l'EDTA ni par de faibles concentrations de détergents (Tween, Triton X-100, Brij) souvent utilisées dans les tests immunologiques.

Ce système peut être étendu à d'autres protéines spécifiques de liaison des immunoglobulines, par exemple, la protéine G. Un autre système d'affinité utilisable dans le dosage des haptènes est celui des lectines et carbohydrates ; la concanavaline A (Con A) est constituée de sous-unités de 26 KD qui formeraient un tétramère. Chaque sous-unité contient un Mn²⁺ et un Ca²⁺ qui sont nécessaires pour l'activité de la Con A. De même, chaque sous-unité a un site de liaison de carbohydrate. Cependant, des excès de métal empêchent cette activité.

De la même façon que le conjugué peut être marqué par des particules colloïdales et notamment par des particules d'or colloïdal, il peut être marqué par un marqueur organométallique permettant de révéler la présence du produit par détection infrarouge, la longueur d'onde d'observation étant dépendante du marqueur utilisé ; l'avantage d'utiliser ce type de marqueur organométallique est que par une utilisation simultanée de plusieurs marqueurs différents à savoir révélables à des longueurs d'ondes différentes en infrarouge, il est possible sur le même dispositif de procéder à des recherches et des caractérisations de différentes molécules présentes dans le même échantillon ou dans des échantillons différents. Pour être lu, le dispositif de l'invention dans lequel le conjugué est marqué par un marqueur de type organométallique, nécessite l'utilisation d'un lecteur simple dans lequel ledit dispositif est disposé après dépôt et migration de l'échantillon.

Dans le dispositif de l'invention, le moyen absorbant qui permet de drainer le liquide de l'échantillon déposé au niveau du réceptacle prévu à cet effet est constitué d'un matériau hygroscopique, notamment des dérivés de cellulose ou la ouate de cellulose, le nylon, des polymères fibreux ou microporeux de type polyester haute densité, des fibres d'origine végétale, animale ou synthétique sous forme de poudres de comprimés ou de couches multiples.

L'invention est relative également à un procédé d'analyse rapide et de caractérisation de la présence d'une molécule de poids moléculaire inférieur à 10 000 daltons, ou haptène, dans un échantillon liquide, ledit procédé étant

10

caractérisé en ce qu'il utilise un dispositif tel que décrit dans ses différents modes réalisation ci-dessus et dans les exemples ci-après et constitué d'un support hydrophile dans lequel un liquide est susceptible de migrer par capillarité, ayant une pluralité de régions distinctes dans lesquelles les réactifs sont déposés par imprégnation et séchés, ce dispositif étant constitué au moins des zones suivantes:

- a) une zone de réception de l'échantillon à tester,
- b) une zone réservoir contenant un conjugué possédant la double caractéristique d'être marqué par un marqueur permettant sa détection directe et d'être un ligand pour la molécule à analyser, ces deux zones étant superposées ou séquentielles,
- c) de deux barrières successives constituées de moitiés de paires d'affinité dont l'une retient ledit conjugué lors de sa migration sur le support en l'absence de la molécule recherchée dans l'échantillon, appelée barrière de lecture négative et l'autre retient ledit conjugué en présence de la molécule recherchée, cette dernière étant alors liée directement ou indirectement audit conjugué, cette deuxième barrière étant alors une zone de lecture positive de la réaction
- d) d'un moyen absorbant et contigu au support hydrophile permettant de favoriser le flux de liquide depuis la zone a) de réception de l'échantillon à travers les autres zones constitutives dudit dispositif,

le support hydrophile et le moyen absorbant étant fixés sur un film de polyéthylène de type « Mylar », l'ensemble étant positionné dans un boîtier muni d'un réceptacle à l'aplomb de la zone a) acceptant 0,05 à 0,5 ml de liquide à tester et de deux fenêtres à l'aplomb des deux barrières successives , permettant la lecture du résultat positif ou négatif de la réaction par l'observation du marquage lié au conjugué,

ledit procédé comprenant le dépôt de 0,05 à 0,5 ml d'échantillon à tester dans la zone de réception prévue à cet effet, suivi de l'observation directe ou indirecte par tout moyen optique approprié du résultat obtenu au niveau des barrières de lecture positive et négative .

L'utilisation d'un dispositif tel que décrit ci-dessus pour détecter et caractériser la présence d'un haptène dans un échantillon liquide est partie intégrante de l'invention. Tout type de molécule ayant son poids inférieur à

10 000 daltons peut être analysé et dosé par un dispositif tel que décrit plus haut; mais l'invention est particulièrement avantageuse quand l'haptène est une drogue que l'on cherche à détecter dans un fluide biologique, ce fluide pouvant être le sang, l'urine ou la salive.

- 5 L'existence d'un diagnostic rapide paraît particulièrement avantageuse lorsque l'on suspecte l'utilisation chez un patient d'une drogue (« drug abuse ») ou lors d'un traitement médicamenteux par des drogues à effets secondaires. Les drogues dont la caractérisation ou le suivi de leur présence dans un fluide biologique peuvent être particulièrement précieux sont, sans caractère limitatif 10 mais pour être les plus importantes, incluses dans l'une des classes suivantes :
- les opiacés, ou alcaloïdes dont la morphine, l'héroïne, la codéine, le dextromethorphan, ou leurs dérivés et métabolites
 - les opiacés de synthèse, dont la méthadone, le propoxyphène, la phénylcyclidine, dérivés et métabolites,
 - 15 - les cannabinoïdes dont le 9-tétrahydrocannabiol (ou cannabis), la cocaïne , le L.S.D., le benzoïl d'ecgonine, la marijuana, leurs dérivés et métabolites,
 - les amphétamines, le MDM(ecstasy), le 2,5 imethoxy-4Methamphétamine , les catécholamines incluant l'ephédrine, la L-Dopa, l'épinéphrine, la narcine, la papavérine ou leurs dérivés et métabolites,
 - 20 - les dérivés ou métabolites de l'acide barbiturique dont le phénobarbital, le secobarbital, la primidone, l'ethosuccimide, la diphenylhydantoïne,
 - les benzodiazépines, leurs dérivés et métabolites,
 - les stéroïdes incluant les oestrogènes, les androgènes, les stéroïdes adrénocorticaux, leurs dérivés et métabolites,
 - 25 - les glycosides et aglycones incluant la digoxine, la digoxigénine, les saponines et sapogénines, leurs dérivés et métabolites,
 - les substances mimant les stéroïdes, tel le diethylsilbestrol.

30 L'homme du métier saura bien entendu adapter le principe du dispositif et du procédé de dosage à la molécule qu'il souhaite doser en respectant les principes mêmes de ce dispositif tels que décrits sommairement ci-dessus et détaillés ci-après dans les exemples. Ce test de diagnostic permet donc en une seule étape, sans étape de lavage ni de révélation enzymatique, ni utilisation d'appareillage complexe, ni de connaissances techniques particulières de

12

déetecter et doser la présence d'un haptène dans un échantillon : le manipulateur applique directement l'échantillon à doser dans le réceptacle prévu à cet effet par exemple à l'aplomb du réservoir contenant le conjugué et laisse la migration se poursuivre pendant quelques minutes. Que les échantillons contiennent ou ne 5 contiennent pas la molécule recherchée, l'une ou l'autre des deux bandes de capture va capturer le conjugué marqué ; l'existence de ces deux bandes de capture positive et négative confère au dispositif un contrôle interne de bon fonctionnement de la réaction. En outre le fait d'avoir une zone de capture aussi 10 bien pour une réaction positive que pour une réaction négative permet de concentrer les réactifs au niveau d'une bande quel que soit le résultat, et par conséquent de doser de faibles quantités de molécules recherchées avec une grande fiabilité. En outre ce test peut être quantitatif grâce aux caractéristiques 15 intrinsèques des réactifs : en effet une coloration apparaît à partir d'une concentration prédéterminée de l'haptène à doser, liée à un équilibre entre le conjugué et le marquage de ce conjugué. Enfin ce type de test présente un coût unitaire très faible et permet donc de l'utiliser de façon extensive sur un site soit à titre de diagnostic soit à titre de prédiagnostic et d'orientation d'un traitement éventuel.

Enfin l'homme du métier saura extrapoler les principes de fonctionnement 20 de ce dispositif à tout test permettant de doser simultanément plusieurs molécules soit sous forme de bandelettes « multistrip » soit en forme de disques comprenant des quartiers dont les barrières sont imprégnées de réactifs spécifiques d'un haptène donné et différents d'un quartier à l'autre soit toute 25 autre géométrie permettant de façon simple de discriminer entre les différentes molécules recherchées au sein d'un même échantillon ou d'un mélange d'échantillons.

Les exemples ci-après qui sont relatifs à des réalisations de dispositifs possibles 30 pour le dosage de l'amphétamine permettront aux lecteurs de bien saisir tous les avantages de ce test quant à sa facilité de mise en oeuvre et sa fiabilité. Ils ne sont bien évidemment pas limitatifs et ne sont là qu'à titre d'illustration. Les figures 1 à 4 représentent les différents dispositifs tels que décrits dans les exemples 1 à 4.

La figure 1 représente un dispositif dans lequel le réservoir (11) contient un conjugué constitué d'un anticorps anti-haptène marqué et couplé à la biotine avec en aval, une barrière de lecture négative (21) constituée d'haptènes fixés sur le support, susceptibles de fixer l'anti-haptène de (11) lorsque celui-ci n'a pas réagi avec l'haptène de l'échantillon, et en aval une barrière de lecture positive est constituée de streptavidine (31) susceptible de capturer l'anti-haptène marqué et couplé d'une part à la biotine et d'autre part à l'haptène de l'échantillon.

La figure 1a représente le dispositif dans son boîtier, lequel boîtier est muni d'un réceptacle (5) permettant le dépôt de l'échantillon ; la figure 1b représente une vue en coupe longitudinale de profil des différents éléments du dispositif comprenant un filtre (6), le réservoir (11), la membrane de nitrocellulose (40), la zone buvard hydroscopique (50), le tout posé sur un support plastique de type « Mylar » (60) ; la figure 1c schématisse le principe du test. La flèche indique le sens de la migration.

La figure 2 représente un dispositif dans lequel le réservoir (12) est rempli d'anticorps anti-haptène marqués, en amont est présent un échantillon d'haptènes couplés à la biotine (15), déposé et déshydraté ; la première barrière de lecture (22) est constituée de streptavidine et la deuxième barrière de lecture est constituée d'un anticorps dirigé contre l'anticorps anti-haptène présent dans le réservoir (12).

La figure 2a représente le dispositif dans son boîtier, lequel boîtier est muni d'un réceptacle (5) permettant le dépôt de l'échantillon ; la figure 2b représente une vue en coupe longitudinale de profil des différents éléments du dispositif comprenant un filtre (6), le réservoir (12), la membrane de nitrocellulose (40), la zone buvard hydroscopique (50), le tout posé sur un support plastique de type « Mylar » (60) ; la figure 2c schématisse le principe du test. La flèche indique le sens de la migration.

La figure 3 représente un mode de réalisation dans lequel le réservoir (13) contient une protéine spécifique de l'haptène à doser, la première barrière (23) est constituée d'un anticorps anti-haptène et la deuxième barrière (33) est constituée d'un anticorps dirigé contre la protéine spécifique telle que déposée dans le réservoir (13) ;

La figure 3a représente le dispositif dans son boîtier, lequel boîtier est muni d'un réceptacle (5) permettant le dépôt de l'échantillon ; la figure 3b représente une vue en coupe longitudinale de profil des différents éléments du dispositif comprenant un filtre (6), le réservoir (13), la membrane de nitrocellulose (40), la zone buvard hydroscopique (50), le tout posé sur un support plastique de type « Mylar » (60) ; la figure 3c schématisse le principe du test. La flèche indique le sens de la migration.

La figure 4 représente un modèle de réalisation dans lequel le réservoir (14) est rempli d'haptènes marqués, la première barrière de lecture négative (24) est constituée d'un premier anticorps anti-haptène et la deuxième barrière de lecture (34) étant constituée d'un deuxième anticorps anti-haptène, l'un et l'autre des deux anticorps ayant une différence d'affinités de 1 à 3 logs.

La figure 4a représente le dispositif dans son boîtier, lequel boîtier est muni d'un réceptacle (5) permettant le dépôt de l'échantillon ; la figure 4b représente une vue en coupe longitudinale de profil des différents éléments du dispositif comprenant le filtre (6), le réservoir (14), la membrane de nitrocellulose (40), la zone buvard hydroscopique (50), le tout posé sur un support plastique de type « Mylar » (60) ; la figure 4c schématisse le principe du test. La flèche indique le sens de la migration.

Dans les figures 1 à 4, le matériel biologique contenu dans le réservoir est soit à l'aplomb, soit légèrement décalé vers l'aval du réceptacle d'échantillon (5).

EXEMPLE 1 : dosage de l'amphétamine selon un premier mode de réalisation.

Ce premier mode de réalisation utilise le système streptavidine-biotine à titre de barrière de lecture positive de réaction.

La figure 1 schématisse le dispositif de ce mode de réalisation, la zone réservoir contenant un conjugué constitué d'un anticorps anti-haptène marqué à l'or colloïdal, l'anti-haptène étant couplé de façon covalente à la biotine.

Un première barrière de lecture négative de la réaction est constituée d'amphétamine fixée sur le support.

Si l'échantillon dont la présence d'haptène est recherchée contient l'amphétamine, cette dernière va alors former un complexe d'affinité avec le conjugué anti-haptène-biotine-or colloïdal et, au cours de la migration par

15

capillarité le long du support ne pas être retenue par la barrière d'haptène (amphétamine fixée), les paratopes du conjugué étant alors saturés par les épitopes correspondants de l'haptène ; il sera au contraire capté au niveau de la barrière streptavidine par formation du complexe streptavidine/biotine-conjugué ; 5 si au contraire l'échantillon ne contient pas d'amphétamine, alors la migration du conjugué va, au niveau de la première barrière d'amphétamine fixée, conduire à la formation d'un complexe amphétamine/conjugué et la coloration alors va se révéler au niveau de cette première barrière.

Autrement dit le marquage au niveau de la première fenêtre 10 correspondant à la barrière d'haptènes indique l'absence d'haptène dans l'échantillon ; la coloration au niveau de la deuxième fenêtre de lecture, au niveau de la streptavidine fixée, indique la présence d'haptène dans l'échantillon.

Mais en tout état de cause, une coloration doit apparaître au niveau de 15 l'une ou l'autre barrière.

Préparation du dispositif.

a) **Préparation du conjugué anti-amphétamine-biotine.**

La biotine NHS est utilisée pour le couplage à l'anticorps anti-amphétamine. Les esters N-hydroxysuccinimide réagissent avec des amines primaires pour former 20 des liaisons amides. La réaction consiste généralement en une attaque nucléophile d'une amine (ϵ pour la plupart des cas). Le résultat en est la formation d'une liaison amide stable avec production de N-hydroxysuccinimide. Cette réaction est favorisée par les pH alcalins favorables à l'état non protoné 25 des amides. Certaines précautions doivent être prises pour l'utilisation de ce type d'esters qui sont peu solubles dans l'eau ; ainsi une présolubilisation dans du dimethyl sulfoxyde (DMSO) ou dans du dimethyl formamide (DMF) est souvent recommandée. L'utilisation de tampons contenant des amines comme les Tris et les azides est formellement déconseillée. L'hydrolyse de l'ester NHS 30 est habituellement la seule réaction qui pourrait interférer avec le couplage lui-même. Cette réaction d'hydrolyse est favorisée par les solutions de protéines très diluées ; elle n'a pas lieu avec des solutions de protéines concentrées.

Réactifs de biotinylation

Matériel

16

Solution d'anticorps à 10mg/ml dans du PBS
Biotine NHS (CALBIOCHEM Réf. 203188)
Tampon carbonate-bicarbonate 0,1 M pH 9,5
Dimethylsulfoxyde (DMSO) (Prolabo Réf. 23486297).

5

- Protocole

1. Dialyser la solution d'anticorps contre du tampon carbonate-bicarbonate 0,1 M pH 9,5.
2. Préparer une solution de biotine à 100 mM en DMSO.
- 10 3. Mélanger la biotine à la solution d'anticorps afin d'être à 10 mM final en biotine.
4. Amener la concentration en protéine à 4 mg/ml en ajoutant du tampon carbonate-bicarbonate 100 mM pH 9,5.
5. Incuber 1 heure, à température ambiante, sous agitation.
- 15 6. Dialyser la solution contre Tampon borate 2 mM pH 9,0.
7. Stocker à 4°C. Ne pas congeler.

b) Préparation du traceur anti-amphétamine-biotine-Or colloïdal

La traceur a un rôle capital: il permet la lecture du résultat du test.
De plus, le choix des conditions de fabrication des particules d'or est très important dans la mesure où leur taille conditionne les performances de migration du test.

b1) Protocole de fabrication des particules d'or colloïdal

1. Les récipients utilisés devront être lavés soigneusement, rincés à l'eau déminéralisée et siliconés.
- 25 2. Préparer une solution d'acide chloroaurique à 0,01% dans de l'eau déminéralisée.
3. Préparer une solution de citrate de sodium à 1% dans de l'eau déminéralisée.
4. Porter à ébullition le volume nécessaire de solution d'acide chloroaurique.
5. Laisser bouillir pendant 10 minutes.
- 30 6. Ajouter la solution de citrate de sodium de façon à obtenir une concentration finale en citrate de sodium de 0,7%.

7. Laisser sous agitation pendant 20 minutes (la solution vire au bleu en 10 minutes puis au rouge en 15 minutes après addition de la solution de citrate de sodium).

b2) Protocole de fabrication du conjugué

5 Dans le cas où un anticorps monoclonal est utilisé, le point isoélectrique est préalablement déterminé par électrophorèse en isoélectrofocalisation (IEF).

L'anticorps est dialysé pendant 2 heures à température ambiante contre une solution de borate de sodium à 2 mM tamponnée à un pH supérieur de 0,5 unité au point isoélectrique de l'anticorps considéré.

10 La concentration de la solution d'anticorps est ajustée à 0,1 mg/ml avec la solution borate de sodium à 2 mM tamponnée à pH9.

A 2 ml de la solution d'anticorps sont ajoutés 20 ml d'une suspension de micro particules d'or colloïdal dont le diamètre moyen est compris entre 10 et 30 nm.

Le mélange est mis sous agitation pendant 5 minutes à température ambiante.

15 Il est centrifugé à 15 000g pendant 30 minutes et à 4°C.

Le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 5 ml d'une solution de Tris 20 mM tamponnée à pH 7,4 et contenant 1% de sérum albumine bovine 0,1% de Tween 20 0,5% de polyéthylène glycol 3000.

20 Le mélange réactionnel est à nouveau centrifugé 2 fois dans les mêmes conditions. A l'issue de la troisième centrifugation, le culot est repris dans 1 ml d'une solution de Tris 20 mM tamponnée à pH 7,4 et contenant 1% de sérum albumine, 0,1% de Tween 20 et 0,5% de polyéthylène glycol 3000.

La densité optique de la solution est mesurée à 595 nm.

La solution de traceur ainsi obtenue est stable 6 mois à 4°C.

25 c) Préparation du support de migration

c₁) Préparation de l'amphétamine BSA

En tant que petite molécule, l'amphétamine ne peut pas être directement fixée sur un support solide. Un couplage préalable à une macromolécule porteuse est nécessaire. La BSA a été choisie comme modèle.

30 La méthode de l'anhydride mixte peut être utilisée pour coupler l'amphétamine à la BSA (Erlanger et al 1959), (4).

18

A 7,94 µmoles de BSA, ajouter 15,9 µmoles de tri-n-butylamine et 8 µmoles d'isobutylchlorocarbonate. La BSA I125 (200 000 dpm, 300pg) est ajoutée au début de la réaction pour servir de marqueur.

- Après 30 mn d'agitation à 10°C, ajouter 0,3 moles d'amphétamine. Le mélange dont le pH est ajusté à 9,5 par la soude est conservé pendant 3 heures à 4°C. Il est ensuite dialysé contre de l'eau distillée pendant une nuit à 4°C. Le pH du dialysat ajusté à 4,5 par de l'HCl 10,1 N et après une nuit à 4°C la suspension obtenue est centrifugée pendant 20 mn à 3000 tr/mn. Le précipité est dissout dans un volume minimum d'eau (<1ml) puis il est lyophilisé et gardé à -20°C.
- Par cette méthode, on arrive à coupler 25 ±3 moles d'amphétamine par mole de BSA.

Coating de la streptavidine, de l'amphétamine et de l'anticorps anti-souris

Déposer 1µl de streptavidine à 10mg/ml dans du PBS

Déposer 1µl de BSA-amphétamine à 4mg/ml dans du PBS

- Déposer 1µl d'anticorps anti-Ig de souris à 10mg/ml dans le tampon Acétate 0,1M pH 4,7.

Attendre 15 mn à température ambiante.

Immerger dans PBS Sucrose 5% Lait 0,5%

Laisser sous agitation pendant 30 minutes à température ambiante (T.A).

- Laver avec du PBS en agitant pendant 15 minutes.

Eliminer le PBS.

Immerger dans une solution de PVA (Polyvinyl-alcool) à 2%.

Laisser 30 minutes sous agitation.

Eliminer la solution de PVA et faire sécher le support à température ambiante.

- Avant utilisation, garder le support sous vide dans du papier aluminium, à température ambiante.

Préparation du réservoir de conjugué

Immerger la feuille de fibre de verre (GF) (200X250 mm) dans la solution de saturation (PBS/Lait 1% Sucrose 5%).

- Laisser 15 minutes à température ambiante.

Laisser sécher 1 nuit à 37°C.

Dépôt du conjugué par spot de 10 µl.

Laisser sécher au moins une heure à température ambiante.

Protocole du test

Déposer 200 µl d'échantillon au niveau du réceptacle. Attendre 5 minutes de migration à température ambiante.

Lire le résultat au niveau des fenêtres de lecture.

5 Echantillon positif

Apparition de signal au niveau de la seconde fenêtre de lecture marquée Positif.

Ce signal correspond à l'arrêt du complexe Amphétamine-Anti-Amphétamine-Or colloïdal-Biotine par la streptavidine.

Echantillon négatif

10 Apparition de signal au niveau de la première fenêtre de lecture marquée Négatif. Ce signal correspond à l'arrêt du conjugué par la barrière d'amphétamine.

EXAMPLE 2 : Dosage de l'amphétamine en utilisant le mode de réalisation n° 2.

15 La figure 2 est une représentation schématique de ce mode de réalisation dans lequel le conjugué est constitué d'un anticorps anti-amphétamine lié à l'or colloïdal déposé dans le réservoir et séché, et en amont dudit conjugué ou contigu dans le réservoir mais non mélangé au conjugué, un échantillon d'amphétamine couplée à la biotine est également déposé puis déshydraté.

20 La bandelette est constituée en aval du réservoir d'une barrière de lecture négative constituée par de la streptavidine fixée puis d'une barrière de lecture positive constituée d'un anticorps dirigé contre l'anticorps anti-amphétamine ; ce dernier étant un anticorps de souris il s'agit donc d'un anticorps antiimmunoglobuline de souris.

25 Préparation de la bandelette

Déposer 1 µl de streptavidine à 10 mg/ml dans du PBS.

Déposer 1µl d'anticorps anti-Ig de souris à 10mg/ml dans le tampon Acétate 0,1M pH 4,7.

Attendre 15 mn à température ambiante.

30 Immerger dans un mélange PBS, Sucrose 5% Lait 0,5%.

Laisser sous agitation pendant 30 minutes à température ambiante.

Laver avec du PBS en agitant pendant 15 minutes.

Eliminer le PBS.

20

Immerger dans une solution de PVA (Polyvinyl-alcool) 0,2%.

Laisser 30 minutes sous agitation.

Eliminer la solution de PVA et faire sécher le support à température ambiante.

Avant utilisation, garder le support sous vide dans du papier aluminium, à température ambiante.

5 Préparation du réservoir conjugué

Immerger la feuille de fibre de verre (GF) (200X250mm) dans la solution de saturation 2 (PBS/Lait 1%/Sucrose 5%),

Laisser 15 minutes à température ambiante,

10 Laisser sécher 1 nuit à 37°C,

Dépôt du conjugué par spot de 10 µl,

Laisser sécher au moins une heure à température ambiante.

Dépôt du complexe Amphétamine-Biotine.

Le complexe Amphétamine-Biotine est préparé selon la méthode exposée plus haut. La Biotine-X-NHS est utilisée pour le couplage à la fonction amine de l'amphétamine.

15 10 µl d'amphétamine-biotine sont déposés sur le réservoir du conjugué.

Protocole du test

Déposer 200 µl d'échantillon. Attendre 5 minutes de migration à température ambiante.

20 Lire le résultat au niveau des fenêtres de lecture.

Echantillon positif

L'amphétamine contenue dans l'échantillon entre en compétition avec l'amphétamine couplée à la biotine (et déposée sur sa trajectoire) pour des sites limités d'anti-amphétamine marqué à l'or colloïdal (traceur).

25 Le traceur est complexé par l'amphétamine à doser. Le complexe migre ; il est ensuite arrêté par la barrière anticorps anti-Ig de souris.

Echantillon négatif

Déposer 200µl d'échantillon au niveau du puits-échantillon. L'amphétamine-biotine complexe tout le traceur anti-amphétamine-or colloïdal. Ce complexe moléculaire est entièrement arrêté au niveau de la fenêtre streptavidine. La seconde fenêtre doit rester incolore.

EXEMPLE 3 : dosage de l'amphétamine par le mode de réalisation n°3.

21

Le mode de réalisation n° 3 est représenté schématiquement sur la figure 3 :

Le conjugué est constitué d'une protéine spécifique susceptible de se coupler avec l'amphétamine en l'occurrence l'alphafoetoprotéine ou AFP, marquée à l'or colloïdal. En aval du réservoir dans le sens de la migration du liquide se trouve

- 5 la première barrière de lecture positive constituée d'un anticorps anti-amphétamine fixé, puis en aval la barrière de lecture négative constituée d'un anticorps dirigé contre l'AFP. Ce système est un dosage de type sandwich car si l'amphétamine se trouve dans l'échantillon elle se retrouvera prise en sandwich entre l'AFP d'une part et l'anticorps anti-amphétamine fixé au niveau de la
10 barrière de lecture positive d'autre part.

Au contraire en l'absence d'amphétamine dans l'échantillon le conjugué va migrer jusqu'à la barrière de lecture négative où il sera capturé par l'anticorps anti-AFP.

Préparation du support de migration

- 15 Déposer simultanément 3 µl d'anticorps anti-amphétamine et 1 µl d'anticorps anti-AFP. Ces deux solutions sont à 10 mg/ml dans du PBS.

Attendre 15 mn à température ambiante.

Immerger dans le tampon PBS Sucrose 5%, Lait 0,5%.

Laisser sous agitation pendant 30 minutes à température ambiante.

- 20 Laver avec du PBS en agitant pendant 15 minutes.

Eliminer le PBS.

Immerger dans une solution de PVA (Polyvinyl-alcool) à 2%.

Laisser 30 minutes sous agitation.

Eliminer la solution de PVA et faire sécher le support à température ambiante.

- 25 Avant utilisation, garder le support sous vide dans du papier d'aluminium, à température ambiante.

Préparation du réservoir de conjugué

Immerger la feuille de fibre de verre (GF) (200X250 mm) dans la solution de saturation 2 (PBS /Lait 1% /Sucrose 5%).

- 30 Laisser 15 minutes à température ambiante.

Laisser sécher 1 nuit à 37°C.

Dépôt du conjugué par spot de 10µl.

Laisser sécher au moins une heure à température ambiante.

Protocole du test

Déposer 200 µl d'échantillon. Attendre 5 minutes de migration à température ambiante.

Lire le résultat au niveau des fenêtres de lecture.

5 Echantillon positif

Déposer 200 µl d'échantillon au niveau du réceptacle. L'amphétamine contenue dans l'échantillon est complexée par le traceur qui est de l'AFP marquée à l'or colloïdal. Ce complexe est arrêté par l'anticorps anti-amphétamine : il y a apparition de signal au niveau de la fenêtre de lecture.

10 Echantillon négatif

Déposer 200 µl d'échantillon au niveau du réceptacle. Le traceur ne s'arrête qu'au niveau de la seconde fenêtre de lecture où est immobilisé par l'anti-AFP.

EXEMPLE 4 : dosage d'amphétamine utilisant à titre de conjugué l'amphétamine marquée à l'or colloïdal et à titre de barrière de lecture positive ou négative de la réaction, deux anticorps anti-amphétamine ayant des affinités différentes pour l'amphétamine comme cela est expliqué ci-dessous.

Choix des anticorps anti-amphétamine

Il s'agit d'une étape cruciale. L'affinité des anticorps pour l'amphétamine est au moins de 10^{-8} M. Le calcul de l'affinité et le choix des anticorps sont faits à partir d'expériences de compétition entre les différentes formes de l'haptène.

Dans le cas de l'amphétamine, l'anticorps 1 est choisi pour avoir une affinité pour l'amphétamine libre de 10^{-10} M. En revanche, sa capacité de fixation du complexe amphétamine-or colloïdal est plus faible.

25 L'anticorps 2 est choisi pour avoir une affinité pour l'amphétamine de l'ordre de 10^{-8} à 10^{-9} M. Il lie de la même façon l'amphétamine complexée à l'or colloïdal.

Préparation du support de migrationCoating des anti-amphétamine

Déposer 1 µl d'anti-amphétamine 1 à 10 mg/ml dans du PBS.

30 Déposer 1 µl d'anti-amphétamine 2 à 5 mg/ml dans du PBS.

Attendre 15 mn à température ambiante.

Immerger dans PBS Sucrose 5% Lait 0,5%

Laisser sous agitation pendant 30 minutes à température ambiante.

23

Laver avec du PBS en agitant pendant 15 minutes.

Eliminer le PBS.

Immerger dans une solution de PVA (Polyvinyl-alcool) à 2%.

Laisser 30 minutes sous agitation.

5 Eliminer la solution de PVA et faire sécher le support à température ambiante.

Avant utilisation, garder le support sous vide dans du papier aluminium, à température ambiante.

Protocole de fabrication du conjugué

Le conjugué Amphétamine-or colloïdal est fabriqué à partir de la BSA-

10 amphétamine, mais il peut également être préparé de façon directe sans recours à une protéine porteuse.

Le protocole de préparation de la BSA-amphétamine est le même que celui qui a été exposé dans l'exemple 1.

La BSA-amphétamine est marquée à l'or colloïdal en suivant le protocole de

15 couplage des anticorps.

Préparation du réservoir de conjugué

Immerger la feuille de fibre de verre (GF) (200X250 mm) dans la solution de saturation (PBS / Lait 1% / Sucrose 5%).

Laisser 15 minutes à Température Ambiante.

20 Laisser sécher 1 nuit à 37°C.

Dépôt du conjugué par spot de 10 µl.

Laisser sécher au moins une heure à température ambiante.

Protocole du test

Déposer 200 µl d'échantillon. Attendre 5 minutes de migration à température

25 ambiante.

Lire le résultat au niveau des fenêtres de lecture.

Echantillon positif

L'amphétamine de l'échantillon rentre en compétition avec l'amphétamine

marquée pour la fixation sur les sites de l'anticorps anti-amphétamine 1. Cette

30 première barrière qui a plus d'affinité pour l'amphétamine libre, fixe celle-ci et laisse passer le conjugué amphétamine-or colloïdal. L'anticorps anti-amphétamine 2 arrête le conjugué et fait apparaître un signal au niveau de la fenêtre marquée Positif.

Echantillon négatif

En l'absence d'amphétamine dans l'échantillon, le traceur est arrêté par la barrière anticorps anti-amphétamine 1. Il apparaît un signal au niveau de la fenêtre marquée Négatif.

5 Le mode de réalisation de ce dosage est représenté dans la figure 4.

Ces 4 modes de réalisation sont des exemples permettant à l'homme du métier de choisir au cas par cas les conditions expérimentales de préparation et de préparation du dispositif et de son utilisation en fonction de l'haptène qu'il souhaite doser.

10 Dans tous les modes de réalisation proposés ici le conjugué doit toujours être en excès par rapport aux quantités suspectées d'haptènes dans l'échantillon si l'on souhaite avoir une réponse de type Oui/Non au niveau de la barrière de lecture positive ou de la barrière de lecture négative.

Néanmoins si l'homme du métier souhaite avoir une quantification de l'haptène 15 recherché dans l'échantillon il sera alors facile pour lui de préparer plusieurs dispositifs, dans la géométrie qu'il préfère, que ce soit en parallèle de type « multistrip » ou en étoile ou toute géométrie qu'il souhaite, et dans laquelle la quantité de conjugué pourra être croissante selon une courbe préalablement établie, ayant permis de préparer des abaques corrélant la quantité d'haptène à 20 la quantité de conjugué.

Il est clair que dans l'exemple 1 par exemple si la quantité de conjugué est telle qu'il ne peut fixer que 50% de l'amphétamine présente dans l'échantillon le résultat sera une coloration équivalente au niveau de la barrière de lecture positive ou de la barrière de lecture négative ; si le conjugué ne peut lier que 25 75% de l'amphétamine présente dans l'échantillon, la coloration sera présente au niveau des deux barrières de lecture mais sera trois fois plus intense au niveau de la barrière de lecture positive (streptavidine) qu'au niveau de la barrière de lecture négative (amphétamine fixée).

La réalisation de tels types d'abaques permettant un dosage quantitatif est donc 30 d'une réalisation aisée pour l'homme du métier.

Est également clair pour l'homme du métier le fait que les deux barrières de lecture positive et négative peuvent selon les cas être réalisées par utilisation d'une substance présentant de l'affinité soit pour le conjugué, soit pour le

complexe conjugué-haptène, soit pour l'haptène quelque soit son partenaire d'affinité ; par exemple si on reprend le mode de réalisation de l'exemple 2 dans lequel la barrière de lecture positive était constituée par un anticorps anti-Ig de souris de telle façon à capter l'anti-amphétamine marquée à l'or colloïdal du 5 conjugué, il est extrêmement facile d'imaginer que cet anticorps anti-Ig de souris puisse être remplacé par une protéine A également susceptible de former un complexe d'affinité avec les immunoglobulines, fixée sur le support.

Le point commun et l'originalité de tous ces tests est :

- le principe d'avoir une double lecture positive et négative c'est-à-dire d'avoir 10 systématiquement un contrôle de bon fonctionnement de la réaction par l'existence d'une coloration quel que soit le résultat du test,
- d'être très simple dans sa réalisation et de ne nécessiter aucun solvant complémentaire à ajouter au moment de la réalisation du test, ni aucun lavage postérieur,
- 15 - de mettre à la disposition des praticiens un dispositif stable dans le temps à température ambiante puisque l'ensemble des composés constitutifs du dispositif sont préalablement déshydratés.

Revendications

1. Dispositif d'analyse rapide et de caractérisation de la présence d'une molécule de poids moléculaire inférieur à 10 000 daltons, ou haptène, dans un échantillon liquide, ledit dispositif étant constitué d'un support hydrophile dans lequel un liquide est susceptible de migrer par capillarité, ayant une pluralité de régions distinctes dans lesquelles les réactifs sont déposés et/ou séchés, ce dispositif étant caractérisé par le fait qu'il est constitué au moins des zones suivantes:
 - 10 a) une zone de réception de l'échantillon à tester,
 - b) une zone réservoir contenant un conjugué possédant la double caractéristique d'être marqué par un marqueur permettant sa détection directe et d'être un ligand pour la molécule à analyser, les zones en a) et b) pouvant être superposées ou séquentielles.
 - 15 c) de deux barrières successives constituées de moitiés de paires d'affinité dont l'une retient ledit conjugué lors de sa migration sur le support en l'absence de la molécule recherchée dans l'échantillon, appelée barrière de lecture négative et l'autre retient ledit conjugué en présence de la molécule recherchée, cette dernière étant alors liée directement ou indirectement audit conjugué, cette 20 deuxième barrière étant alors une zone de lecture positive de la réaction,
 - d) un moyen absorbant et contigu au support hydrophile permettant de favoriser le flux de liquide depuis la zone a) de réception de l'échantillon à travers les autres zones constitutives dudit dispositif,
le support hydrophile et le moyen absorbant étant fixés sur un film de
 - 25 polyéthylène de type « Mylar », l'ensemble étant positionné dans un boîtier muni d'un réceptacle à l'aplomb de la zone a) acceptant 0,05 à 0,5 ml de liquide à tester et de deux fenêtres à l'aplomb des deux barrières successives, permettant la lecture du résultat positif ou négatif de la réaction par l'observation du marquage lié au conjugué.
- 30 2. Dispositif selon la revendication 1 caractérisé en ce que le réservoir est constitué d'un matériau choisi parmi la fibre de verre, la cellulose, les dérivés de cellulose, le nylon, des polymères fibreux ou microporeux de type polyester

haute densité, des fibres d'origine végétales, animale ou synthétiques sous forme de poudres de comprimés ou de couches multiples, ou de ouate de cellulose.

- 5 3. Dispositif selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que le marqueur du conjugué est constitué de particules colloïdales contenant un métal, de préférence de l'or.
- 10 4. Dispositif selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que le marqueur du conjugué est un marqueur organo-métallique.
- 15 5. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que l'ensemble des éléments qui lui sont constitutifs sont déshydratés.
- 20 6. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que les paires d'affinité sont choisies parmi les groupes constitués par la biotine avec l'avidine ou la streptavidine, les anticorps avec les antigènes, les immoglobulines avec une protéine affine telles la protéine A ou la protéine G, les carbohydrates avec les lectines.
- 25 7. Dispositif selon la revendication 1 à 6 caractérisé en ce que le conjugué marqué contenu dans le réservoir est constitué d'un anticorps anti-haptène marqué notamment à l'or colloïdal et couplé à la biotine, et en ce que la barrière de lecture de réaction négative est constituée d'une quantité déterminée d'haptène fixé et en ce que la barrière de lecture positive est constituée d'avidine ou de streptavidine fixée.
- 30 8. Dispositif selon la revendication 1 caractérisé en ce que le réservoir contient en amont du conjugué marqué par rapport au sens de migration du liquide par capillarité, un autre conjugué constitué d'une quantité déterminée de la molécule dont la présence est recherchée couplée directement ou indirectement à un ligand de la substance constitutive de la barrière de lecture de réaction négative.

9. Dispositif selon la revendication 8 caractérisé en ce que le conjugué marqué est constitué d'un anticorps anti-haptène marqué notamment à l'or colloïdal, en ce que le deuxième conjugué est constitué de l' haptène recherché couplé à la biotine, en ce que la barrière de lecture négative est constituée de streptavidine et en ce que la barrière de lecture positive est constituée d'un anticorps dirigé contre le conjugué marqué.
10. Dispositif selon la revendication 1 caractérisé en ce que le conjugué marqué contenu dans le réservoir est constitué d'une substance spécifique présentant un affinité pour l'haptène marquée notamment à l'or colloïdal, et en ce que la barrière de lecture de réaction positive est constituée d'une quantité déterminée d'anticorps anti-haptène fixé et en ce que la barrière de lecture négative est constituée d'une substance fixée ayant une affinité pour ladite substance spécifique, notamment un anticorps.
11. Dispositif selon la revendication 10 caractérisé en ce que la substance spécifique présentant un affinité pour l'haptène est l'alpha-fetoprotéine .
12. Dispositif la revendication 1 caractérisé en ce que le moyen absorbant est constitué d'un matériau hygroscopique, notamment des dérivés de cellulose ou la ouate de cellulose, le nylon, des polymères fibreux ou microporeux de type polyester haute densité, des fibres d'origine végétales, animalé ou synthétiques sous forme de poudres de comprimés ou de couches multiples.
13. Ensemble de dispositifs selon les revendication\$ 1 à 12 caractérisé en ce que chaque dispositif contient une quantité de conjugué croissante permettant un dosage quantitatif de l'haptène par corrélation avec une abaque pré-établie.
14. Procédé d'analyse rapide et de caractérisation de la présence d'une molécule de poids moléculaire inférieur à 10 000 daltons, ou haptène, dans un échantillon liquide , ledit procédé caractérisé en ce qu'il utilise un dispositif ou un ensemble de dispositifs selon l'une des revendications 1 à 11 et constitués d'un support hydrophile dans lequel un liquide est susceptible de migrer par

- ensemble de dispositifs selon l'une des revendications 1 à 11 et constitués d'un support hydrophile dans lequel un liquide est susceptible de migrer par capillarité, ayant une pluralité de régions distinctes dans lesquelles les réactifs sont déposés par imprégnation et séchés, ce dispositif étant caractérisé étant 5 constitué au moins des zones suivantes:
- a) une zone de réception de l'échantillon à tester,
 - b) une zone réservoir contenant un conjugué possédant la double caractéristique d'être marqué par un marqueur permettant sa détection directe et d'être un ligand pour la molécule à analyser,
 - 10 c) de deux barrières successives constituées de moitiés de paires d'affinité dont l'une retient ledit conjugué lors de sa migration sur le support en l'absence de la molécule recherchée dans l'échantillon, appelée barrière de lecture négative et l'autre retient ledit conjugué en présence de la molécule recherchée, cette dernière étant alors liée directement ou indirectement audit conjugué, cette 15 deuxième barrière étant alors une zone de lecture positive de la réaction
 - d) d'un moyen absorbant et contigu au support hydrophile permettant de favoriser le flux de liquide depuis la zone a) de réception de l'échantillon à travers les autres zones constitutives dudit dispositif,
- le support hydrophile et le moyen absorbant étant fixés sur un film de 20 polyéthylène de type « Mylar », l'ensemble étant positionné dans un boîtier muni d'un réceptacle à l'aplomb de la zone a) acceptant 0,05 à 0,5 ml de liquide à tester et de deux fenêtres à l'aplomb des deux barrières successives , permettant la lecture du résultat positif ou négatif de la réaction par l'observation du marquage lié au conjugué,
- 25 ledit procédé comprenant le dépôt de 0,05 à 0,5 ml d'échantillon à tester dans la zone de réception prévue à cet effet, suivi de l'observation directe ou indirecte par tout moyen optique approprié du résultat obtenu au niveau des barrières de lecture positive et négative .
- 30 15. Utilisation d'un dispositif selon l'une des revendications 1 à 13 pour détecter et caractériser la présence d'une molécule de poids moléculaire inférieur à 10 000 daltons, ou haptène, dans un échantillon liquide.

30¹

16. Utilisation selon la revendication 15 associant des dispositifs selon l'une des revendications 1 à 12 caractérisé en ce qu'ils contiennent des quantités de conjugué croissante, permettant un dosage quantitatif de l'haptène par corrélation avec une abaque pré-établie.

5

17. Utilisation selon la revendication 15 ou 16 caractérisée en ce que l'haptène est une drogue que l'on cherche à détecter dans un fluide biologique.

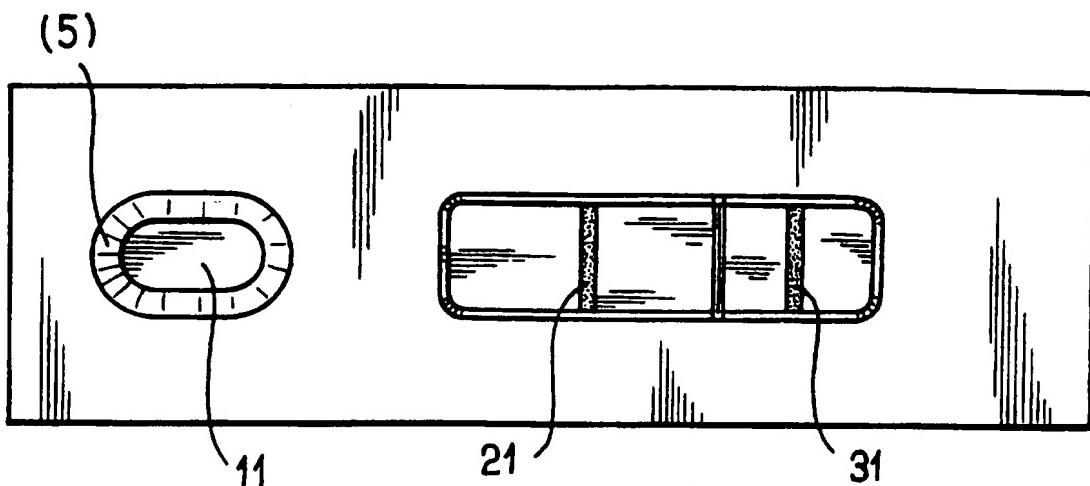
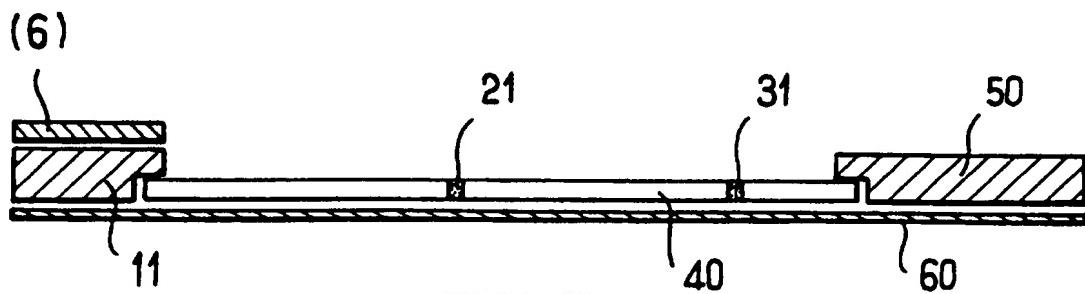
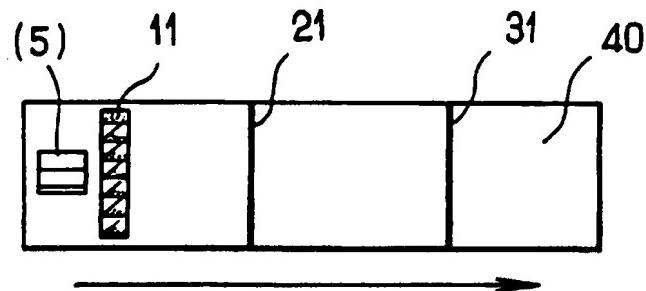
18. Utilisation selon l'une des revendications 15 à 17 caractérisée en ce que la drogue est notamment incluse dans l'une des classes suivantes:

- les opiacés, ou alcaloïdes dont la morphine, l'héroïne, la codéine, le dextromethorphan, ou leurs dérivés et métabolites
- les opiacés de synthèse, dont la méthadone, le propoxyphène, la phénylcyclidine,
- les cannabinoïdes dont le 9-tétrahydrocanabinol (ou cannabis), la cocaïne , le LSD, le benzoïl d'ecgonine, leurs dérivés et métabolites
- les amphétamines, le MDM(ecstasy), le 2,5 imethoxy-4Methamphétamine , les catécholamines incluant l'ephédrine, la L-Dopa, l'épinéphrine, la narcine, la papavérine ou leurs dérivés et métabolites
- les dérivés ou métabolites de l'acide barbiturique dont le phénobarbital, le sécobarbital, la primidone, l'ethosuccimide, la diphenylhydantoïne
- les benzodiazépines, leurs dérivés et métabolites.

19. Utilisation selon l'une des revendications 15 à 17 caractérisée en ce que la drogue est notamment incluse dans l'une des classes suivantes:

- les stéroïdes incluant les oestrogènes, les androgènes, les stéroïdes adrénocorticaux, leurs dérivés et métabolites
- les glycosides et aglycones incluant la digoxine, la digoxigénine, les saponines et sapogénines, leurs dérivés et métabolites
- les substances mimant les stéroïdes, tel le diéthylsilbestrol.

1 / 4

FIG. 1aFIG. 1bFIG. 1c

2 / 4

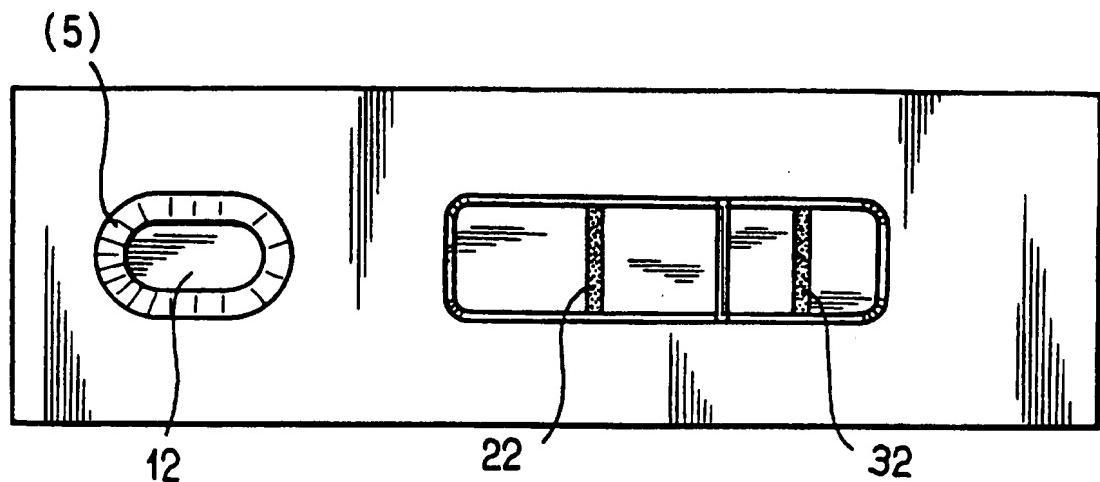


FIG. 2a

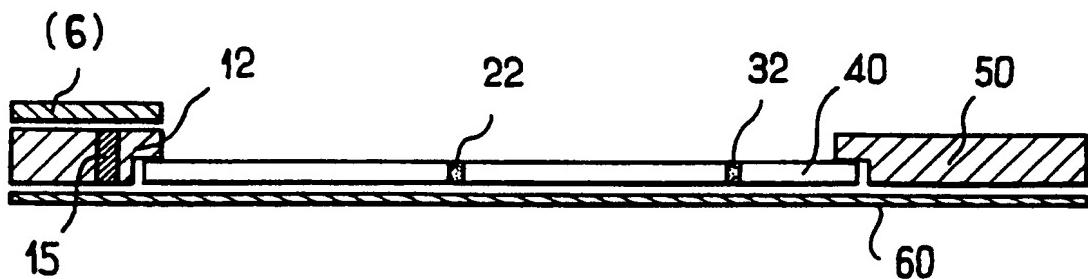


FIG. 2b

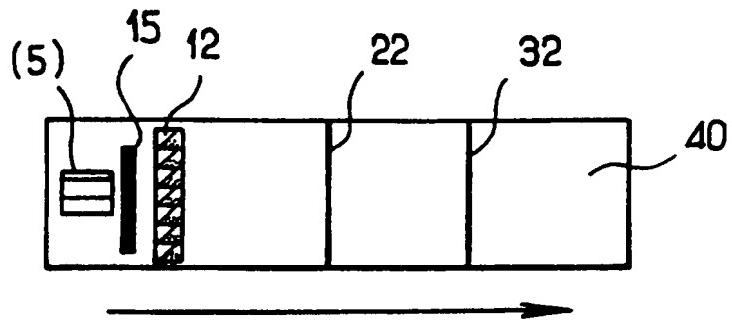


FIG. 2c

3 / 4

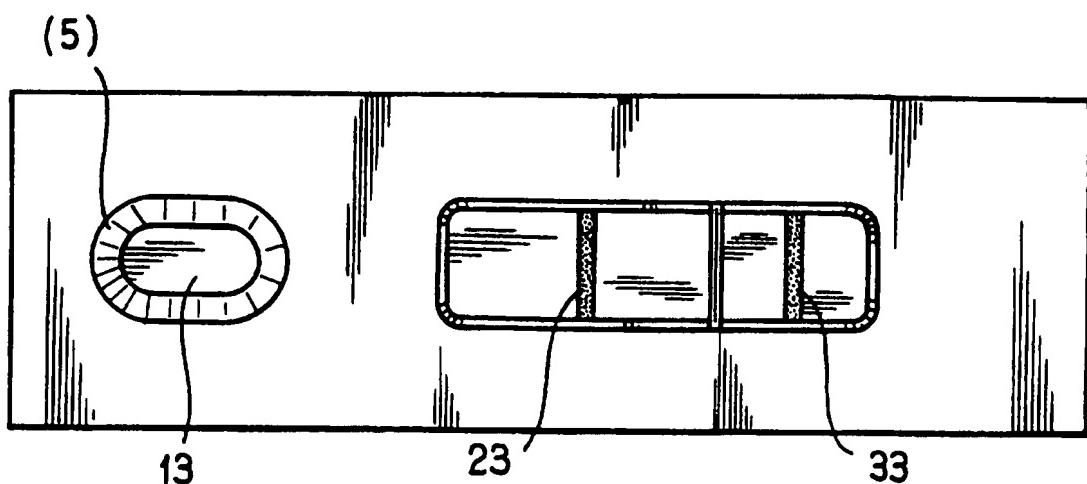


FIG. 3a

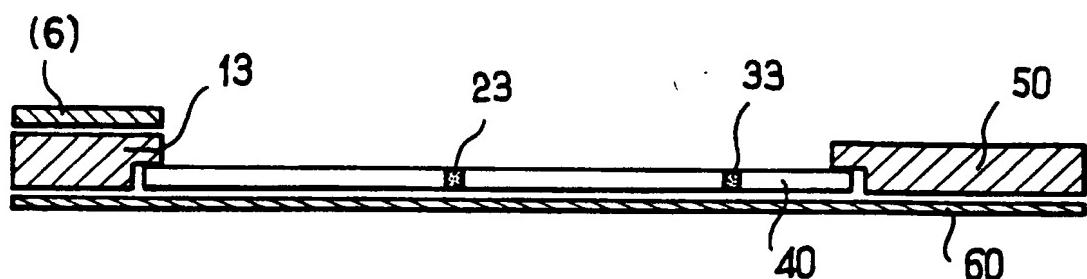


FIG. 3b

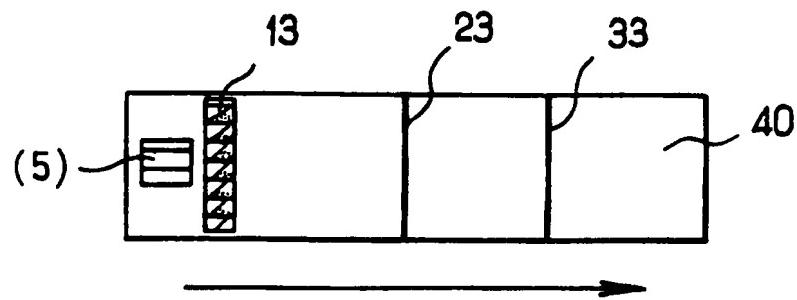
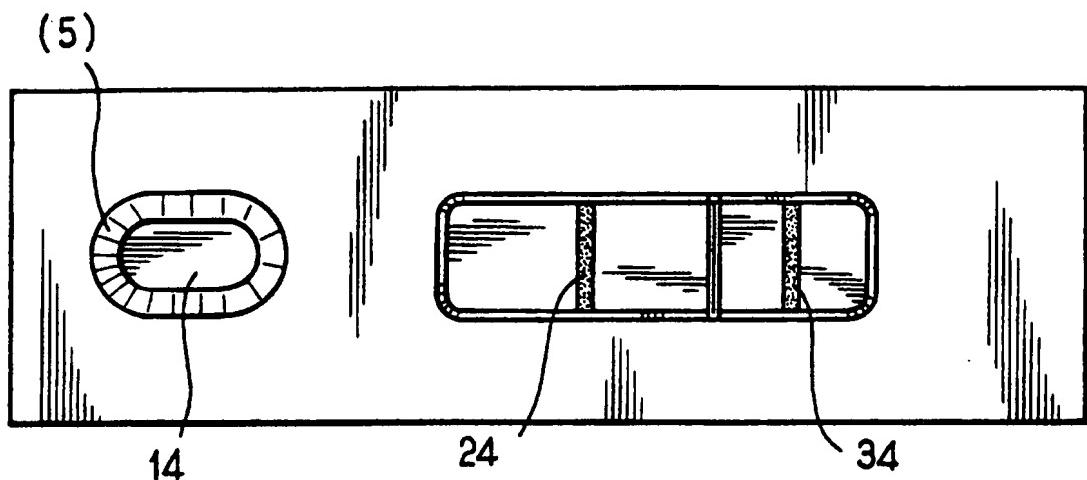
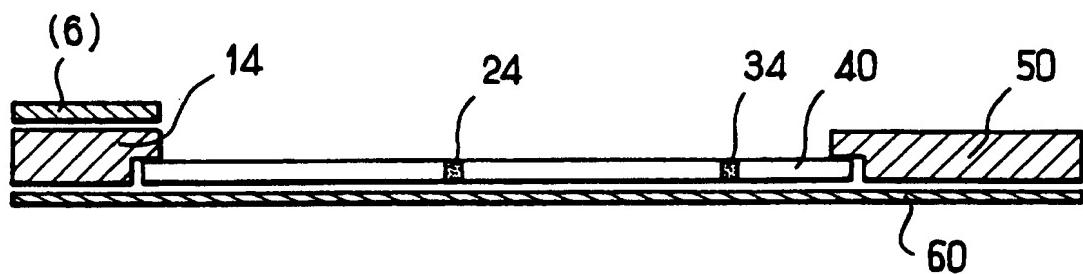
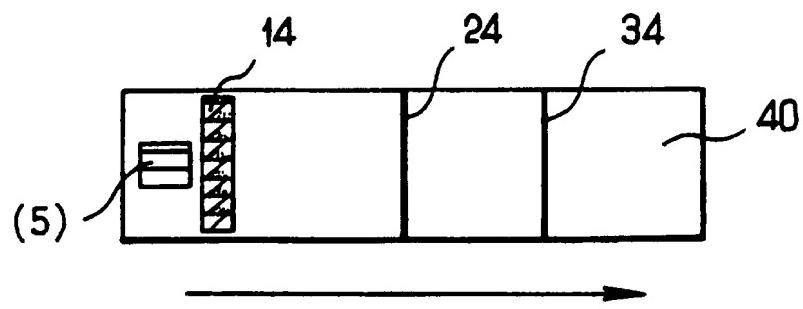


FIG. 3c

4 / 4

FIG. 4aFIG. 4bFIG. 4c

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 95/01259

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N33/558 G01N33/543

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,93 03175 (SEREX INC) 18 February 1993 see the whole document ---	1-6
Y	WO,A,91 12528 (HYGEIA SCIENCES LTD) 22 August 1991 cited in the application see the whole document ---	1-19
A	EP,A,0 585 912 (BECTON DICKINSON CO) 9 March 1994 ---	
A	WO,A,86 04683 (BOEHRINGER BIOCHEMIA SRL) 14 August 1986 -----	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- '&' document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

9 January 1996

Date of mailing of the international search report

16.01.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Cartagena y Abella, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 95/01259

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9303175	18-02-93	US-A-	5451504	19-09-95
		AU-B-	2418192	02-03-93
WO-A-9112528	22-08-91	US-A-	5141850	25-08-92
		AU-B-	7445891	03-09-91
		CA-A-	2073504	08-08-91
		EP-A-	0514489	25-11-92
EP-A-0585912	09-03-94	AU-B-	660837	06-07-95
		AU-B-	4476693	10-03-94
		CA-A-	2105438	05-03-94
		JP-A-	6174711	24-06-94
WO-A-8604683	14-08-86	EP-A-	0243370	04-11-87
		JP-T-	62501989	06-08-87
		OA-A-	8640	30-11-88

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 95/01259

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 G01N33/558 G01N33/543

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO,A,93 03175 (SEREX INC) 18 Février 1993 voir le document en entier ---	1-6
Y	WO,A,91 12528 (HYGEIA SCIENCES LTD) 22 Août 1991 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-19
Y	WO,A,91 12528 (HYGEIA SCIENCES LTD) 22 Août 1991 cité dans la demande voir le document en entier ---	1-19
A	EP,A,0 585 912 (BECTON DICKINSON CO) 9 Mars 1994 ---	
A	WO,A,86 04683 (BOEHRINGER BIOCHEMIA SRL) 14 Août 1986 -----	

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- 'A' document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- 'E' document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- 'L' document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- 'O' document se référant à une divulgarion orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- 'P' document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- 'T' document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- 'X' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- 'Y' document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- '&' document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

9 Janvier 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

16. 01. 96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Cartagena y Abella, P

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux familles de brevets

Document Internationale No
PCT/FR 95/01259

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication	
WO-A-9303175	18-02-93	US-A- AU-B-	5451504 2418192	19-09-95 02-03-93
WO-A-9112528	22-08-91	US-A- AU-B- CA-A- EP-A-	5141850 7445891 2073504 0514489	25-08-92 03-09-91 08-08-91 25-11-92
EP-A-0585912	09-03-94	AU-B- AU-B- CA-A- JP-A-	660837 4476693 2105438 6174711	06-07-95 10-03-94 05-03-94 24-06-94
WO-A-8604683	14-08-86	EP-A- JP-T- OA-A-	0243370 62501989 8640	04-11-87 06-08-87 30-11-88